

# NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

Tytuł projektu: **Badania aktywności przeciwnowotworowej preparatu NanForce**

1. Czas trwania projektu 01.07.2016 - 01.07.2017

2. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): aktywność przeciwnowotworowa, nanocząstki srebra i tlenku cynku

3. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych) Badania translacyjne lub stosowane

A. Badania podstawowe

B. Badania translacyjne lub stosowane

C. Badania mające na celu zachowanie gatunku

D. Badania z zakresu medycyny sądowej

E. Badania zapewniające poprawę dobrostanu zwierząt lub warunków chowu lub hodowli zwierząt gospodarskich

F. Badania w celu opracowania i produkcji produktów leczniczych, środków spożywczych, pasz lub innych substancji lub produktów, lub badań ich jakości, skuteczności lub bezpieczeństwa stosowania

G. Badania w celu ochrony środowiska naturalnego

H. Badania w celu kształcenia na poziomie szkolnictwa wyższego lub szkolenia w celu nabycia lub doskonalenia kompetencji zawodowych

## 5. OPIS PLANOWANEGO DOŚWIADCZENIA

Należy określić cel naukowy lub edukacyjny doświadczenia, w tym przewidywane szkody, jakie może ono spowodować u wykorzystywanych zwierząt, i korzyści, jakie przyniesie ono dla rozwoju nauki i dydaktyki. Maksymalnie 250 słów, tekst musi być zrozumiały dla niespecjalisty.

Z roku na rok liczba odnotowanych zachorowań na nowotwory drastycznie wzrasta. Poszukuje się narzędzi, które będą pozwalały eliminować zmienione komórki o fenotypie nowotworowym, nie tylko szybko, ale również bardzo specyficznie, nie uszkadzając przy tym komórek prawidłowych. Chemioterapia i terapia hormonalna to klasyczne formy systemowego leczenia chorób nowotworowych, których niepodważalne znaczenie terapeutyczne, szczególnie w połączeniu z nowoczesną chirurgią i radioterapią, w istotny sposób przełożyło się na wyniki kliniczne. W żadnym jednak przypadku nie można mówić o spektakularnym przełomie. Leczenie chorób nowotworowych to ciągle wyzwanie dla medycyny, naukowcy nie ustają w poszukiwaniu nowych, bardziej skutecznych metod terapii

Na zlecenie firmy PERFAND chcemy przeprowadzić badania aktywności przeciwnowotworowej preparatu NanForce (którego firma ta jest twórcą), który jest mieszaniną 1:1 koloidalnego srebra i koloidalnego tlenku cynku. Nanocząstki ze względu na swoje nadzwyczaj małe rozmiary, mogą

wykazywać różne właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne oraz łatwiej penetrować komórki. Nanotechnologie mają szerokie zastosowanie w badaniach nad nowotworami: w diagnostyce, monitoringu i strategiach terapeutycznych.

Srebro koloidalne posiada właściwości bakterio- grzybo- i wirusobójcze, dlatego w XIX i na początku XX wieku, czyli w czasach, kiedy nie było jeszcze antybiotyków, było ono wykorzystywane w leczeniu licznych schorzeń, których przyczynami były chorobotwórcze drobnoustroje. Badania *in vitro* z zastosowaniem nanocząsteczek srebra Ag-NP przeprowadzone na ludzkich komórkach raka mózgu U251 wykazały hamowanie proliferacji tych komórek. Mechanizm działania polegał głównie na produkcji wolnych rodników, które mogą stymulować śmierć komórki. Reagując z białkami, upośledzają ich funkcję na skutek utleniania. Inne zmiany w komórkach obserwowane po inkubacji z Ag-NP to m.in. zmiany w cytoszkielecie i chromosomach.

Tlenek cynku wykorzystywany jest głównie w kosmetyce jako naturalny filtr UV, chroni skórę przed skutkami promieniowania słonecznego. Przyspiesza także gojenie się ran, owrzodzeń i podrażnień, działa antybakteryjnie, ściągająco, pomaga w leczeniu trądziku oraz zmniejsza stany zapalne. Badania wykazały, że dzięki swoim właściwościom fizycznym i chemicznym może mieć zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej. Dokładny mechanizm działania nanocząstek tlenku cynku (ZnO-NP) nie jest znany, wiadomo, że generują powstawanie wolnych rodników. Badania *in vitro* wykazały hamowanie proliferacji kilku mysich i ludzkich linii nowotworowych przy jednoczesnym braku cytotoksyczności wobec prawidłowych fibroblastów. Dodatkowo ZnO-NP powodowały zatrzymanie cyklu komórkowego i indukcję apoptozy (śmierci) komórek białaczki.

W ramach własnych badań nad preparatem NanForce przeprowadziliśmy badania *in vitro*, które wykazały hamowanie wzrostu komórek ludzkiego raka płuc, jelita grubego, raka piersi, raka trzustki oraz mysiego czerniaka. Badany preparat hamował też wzrost prawidłowych mysich fibroblastów ale dwukrotnie słabiej niż zastosowana kontrolnie cisplatyna. Dla preparatu NanForce przeprowadzone zostały analizy chemiczne oraz badania toksyczności ostrej po podaniu dożylnym. Badania toksyczności nie wykazały toksycznego wpływu na zdrowie szczurów.

Celem naszych badań będzie ocena aktywności przeciwnowotworowej preparatu NanForce w trzech modelach ludzkich nowotworów: raka płuc A549, raka jelita grubego HT-29 i raka gruczołu sutkowego MDA-MB-231 wszczepionych podskórnie myszom. Określać będziemy wpływ NanForce na wzrost guza nowotworowego oraz na stan zdrowia myszy (pomiar masy ciała, po zakończeniu badania analiza morfologiczna i biochemiczna krwi oraz ocena makroskopowa narządów).

## 6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

W badaniu planowane jest wykorzystanie 150 samic myszy szczepu SCID (CB-17 -PrkdcScid), w wieku 6-8 tygodni.

## 7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA<sup>1</sup>

Celem doświadczenia jest zbadanie wpływu preparatu NanForce, który jest mieszaniną nanocząstek koloidalnego srebra i koloidalnego tlenku cynku, na proces nowotworowy u myszy, po podskórnym wszczepieniu ludzkich modeli nowotworowych. W badaniach konieczne jest użycie zwierząt ponieważ tylko w żywym organizmie w pełni można zbadać wpływ badanych substancji na proces nowotworowy, który zależny jest od wielu złożonych interakcji pomiędzy komórkami nowotworowymi, a komórkami śródbłonki i komórkami układu immunologicznego. Ponadto w badaniach *in vitro* nie ma możliwości odtworzenia układu odzwierciedlającego stan obserwowany podczas rozwoju nowotworu w organizmie. Na tej podstawie, zgodnie z międzynarodowymi normami badań przesiewowych, wybierane są modele zwierzęce *in vivo* stanowiące niezbędne poprzedzenie ewentualnych badań klinicznych.

Planowane badania *in vivo* preparatu NanForce poprzedzone zostały badaniami *in vitro* na różnych liniach nowotworowych: ludzkiego raka płuc A549, ludzkiego raka jelita grubego LoVo, ludzkiego raka gruczołu sutkowego MCF-7, mysiego czerniaka B16 i ludzkiego raka trzustki AsPC-1. Badany preparat wykazał dużą aktywność antyproliferacyjną z  $IC_{50}$  (stężenie powodujące zahamowanie proliferacji komórek o 50%) od 1,7 do 11,3  $\mu\text{g/ml}$  (dużo wyższą od aktywności samych nanocząstek srebra czy nanocząstek tlenku cynku, jakie pokazują dane literaturowe,  $IC_{50}$  ok. 5,6 - 21,7  $\mu\text{g/ml}$ ). Wartości  $IC_{50}$  dla NanForce były porównywalne z  $IC_{50}$  kontrolnego cytostatyku cisplatyny dla 2 z pośród badanych linii komórkowych: A549 i MCF-7.

Na podstawie wyników zahamowania proliferacji komórek dokonano wyboru 3 modeli nowotworów do badań *in vivo*: raka płuc A549, raka gruczołu sutkowego MCF-7 i raka jelita grubego HT-29.

Przeprowadzono także badania toksyczności ostrej po podaniu dożylnym w Instytucie Przemysłu Organicznego oddział w Pszczynie. Badania toksyczności po podaniu dożylnym dawek 300 i 2000  $\text{mg/kg m.c}$  i po 14 dniowej obserwacji zwierząt nie wykazały toksycznego wpływu na zdrowie szczurów. W badaniach tych jednak nie przeprowadzono szczegółowych badań np. badań morfologicznych czy biochemicznych krwi oraz badań histologicznych narządów, w celu stwierdzenia uszkodzenia narządów wewnętrznych. W planowanym badaniu przeprowadzimy analizę krwi: morfologiczną i biochemiczną (zwłaszcza parametry wątrobowe i nerkowe) i pobrane zostaną tkanki do badań histologicznych.

Dane literaturowe badające toksyczność nanocząstek srebra wskazują, że po podaniu doustnym (przegląd literatury pozwolił na uzyskanie danych tylko dla podania doustnego czy inhalacyjnego), codziennie przez 28-90 dni może mieć niekorzystny wpływ na zdrowie zwierząt. Niekorzystne efekty to głównie uszkodzenie nerek i wątroby (zaburzenia w parametrach biochemicznych oraz zmiany w histologii) gdyż nanaocząstki zarówno srebra jak i tlenku cynku mogą kumulować się w tych narządach.

<sup>1</sup> Przy wypełnianiu wzorować się na instrukcji wypełniania wniosku W1 punkt. 8

Wartości NOAEL dla nanocząstek srebra (najwyższy poziom bez obserwowanego działania toksycznego) w badaniu na myszach wyniosło 0,5 mg/kg, (przy podaniu doustnym przez 28 dni [1]) oraz 30 mg/kg w badaniu na szczurach (podanie doustne przez 90 dni [2]). Badania były prowadzone jednak dla cząstek o wielkości 42 i 56 nm. W preparacie NanForce wielkość cząstek srebra to 100-1000 nm. Badania wykazały że podane doustnie przez 14 dni nanocząstki o wielkości 323 nm nie wykazały toksycznego wpływu na zdrowie zwierząt. Wykazano, że duże nanocząstki nie przechodzą do krwioobiegu po podaniu doustnym (brak akumulacji w mózgu, płucach, wątrobie, nerkach) [1]. Dlatego dla preparatu NanForce wybraliśmy podanie dożylne i trzy dawki: niską 5 mg/kg, pośrednią 50 mg/kg i wyższą 500 mg/kg. Dawka 500 mg/kg podana max. 6 razy łącznie da dawkę 3000 mg, która jest wyższa od dawki użytej w badaniach toksyczności ostrej (LD50 powyżej 2000 mg/kg). Pozwoli nam to na wybranie dawki hamującej wzrost guzów nowotworowych przy jednoczesnym braku negatywnego wpływu na narządy wewnętrzne. Przegląd literatury pozwolił na uzyskanie danych odnośnie toksyczności in vivo nanocząstek srebra czy tlenku cynku, natomiast nie udało się znaleźć badań in vivo nad aktywnością przeciwnowotworową, co dodatkowo skłania nas do przeprowadzenia takich badań.

W doświadczeniach zaplanowano wykorzystanie minimalnej liczby zwierząt, takiej która umożliwi uzyskanie istotnych wyników (istotnych statystycznie).

Myszy wykorzystywane do zaplanowanych doświadczeń utrzymywane będą w warunkach, zapewniających dobrostan zwierząt. Zaplanowane procedury zaprojektowano tak, by możliwie maksymalnie ograniczyć liczbę zwierząt w badaniu oraz by zminimalizować ból, cierpienie i dystres wykorzystywanych zwierząt. W przypadku zaobserwowania znacznego pogorszenia stanu zdrowia zwierząt zostanie zastosowane wczesne, humanitarne zakończenie procedury. Ponadto u myszy z wyraźnym guzem nowotworowym stosowany będzie preparat przeciwbólowy a procedura będzie prowadzona do wielkości guzów 2000 mm<sup>3</sup>.

[1] Repeated-dosetoxicity and inflammatoryresponses in mice by oraladministration of silvernanoparticles. Eun-Jung Parka, EunjooBaeb, JongheopYib, YounghunKimc, KyungheeChoid, SangHeeLeed, JunheonYoond, ByungChunLeed, Kwangsik Parka. EnvironmentalToxicology and Pharmacology 30 (2010) 162–168

[2] Subchronicoraltoxicity of silvernanoparticles. YongSoon Kim, Moon Yong Song, Jung Duck Park, KyungSeuk Song, HyeonRyol Ryu1, YongHyunChung, HeeKyungChang, JiHyun Lee, KyungHuiOh, Bruce J Kelman, In KooHwang, Il Je Yu. Particle and FibreToxicology 2010, 7:20